

(19) RÉPUBLIQUE FRANÇAISE  
INSTITUT NATIONAL  
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE  
PARIS

(11) N° de publication : **2 607 507**  
(à utiliser que pour les  
commandes de reproduction)

(21) N° d'enregistrement national : **86 16797**

(51) Int Cl<sup>e</sup> : C 07 H 21/00; A 61 K 31/715; C 12 Q  
1/68.

(12)

## BREVET D'INVENTION

B1

(54) NOUVEAUX DERIVES A-D-OLIGONUCLEOTIDES, LEUR PREPARATION ET LEUR EMPLOI

(22) Date de dépôt : 02.12.86.

(30) Priorité :

(60) Références à d'autres documents nationaux  
apparentés :

(71) Demandeur(s) : CENTRE NATIONAL DE LA  
RECHERCHE SCIENTIFIQUE CNRS, Etablis-  
sement public national à caractère scientifique  
et technologique. -FR.

(43) Date de la mise à disposition du public  
de la demande : 03.06.88 Bulletin 88/22.

(45) Date de la mise à disposition du public du  
brevet d'invention : 13.04.90 Bulletin 90/15.

(72) Inventeur(s) : CLAUDE HELENE ; THANH  
THUONG NGUYEN

(56) Liste des documents cités dans le rapport  
de recherche :

*Se reporter à la fin du présent fascicule*

(73) Titulaire(s) :

(74) Mandataire(s) : RHONE POULENC INTER-  
SERVICES

FR 2 607 507 - B1



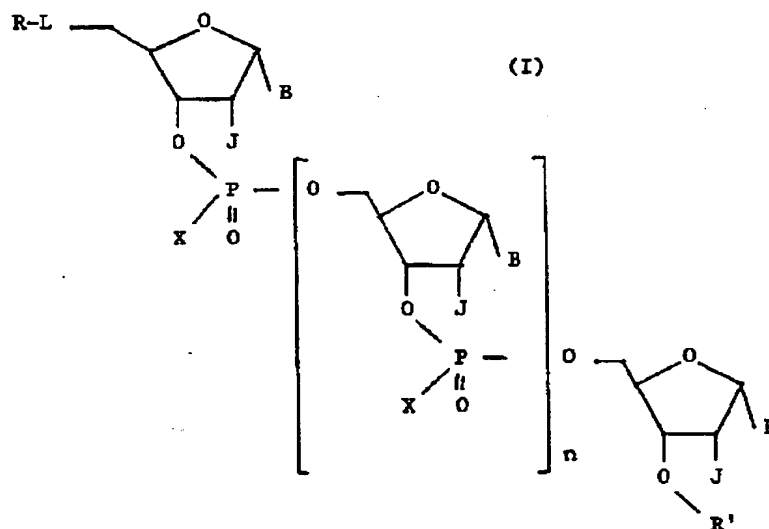
La présente invention concerne de nouveaux dérivés d' $\alpha$ -D-oligonucléotides, leur préparation et leur emploi notamment comme sondes permettant la détection d'une séquence définie d'acides nucléiques, comme nucléases artificielles spécifiques de séquences d'ADN ou d'ARN ou bien comme agents de blocage sélectif de l'expression d'un gène qu'il soit endogène (par exemple, gène oncogène) ou exogène (par exemple ADN ou ARN de virus, de parasites ou de bactéries).

Dans les demandes de brevet français FR 8301223 (2 540 122) et FR 8411795 (2 568 254) ont été décrits des composés chimiques constitués par un oligonucléotide ou un oligodésoxynucléotide comportant un enchaînement de nucléotides naturels ou modifiés, c'est-à-dire des  $\beta$ -D-nucléotides, sur lequel se trouve fixé par une liaison covalente au moins un groupe intercalant, qui possèdent la propriété de bloquer sélectivement l'expression d'un gène et qui, de ce fait, sont particulièrement utiles en thérapeutique comme substances antivirales, antibiotiques, antiparasitaires ou antitumorales.

Dans la demande internationale PCT WO 83/01451 a été décrite une méthode pour bloquer la traduction de l'ARN messager (mRNA) en protéine par hybridation du mRNA avec un oligonucléotide ayant la séquence complémentaire du mRNA, l'oligonucléotide étant stabilisé sous forme phosphotriester.

Il a maintenant été trouvé, et c'est ce qui fait l'objet de la présente invention, que des dérivés d' $\alpha$ -D-nucléotides forment des complexes d'hybridation avec les séquences complémentaires d'ARN beaucoup plus stables que ceux formés avec l'ADN et que, vis-à-vis des ARNs, les dérivés d' $\alpha$ -D-nucléotides forment des complexes d'hybridation plus stables que les dérivés de  $\beta$ -D-nucléotides naturels.

10 Les nouveaux dérivés d' $\alpha$ -D-oligonucléotides selon la présente invention sont les produits de formule générale :



dans laquelle :

- les radicaux B, identiques ou différents, représentent chacun une base nucléique naturelle ou modifiée activable et/ou comportant un groupement intercalant,

5 - les radicaux X, identiques ou différents, représentent chacun un oxoanion  $O^-$ , un thioanion  $S^-$ , un radical alkyle ou alcoxy substitué éventuellement par un hétérocycle azoté, un radical aminoalkyle, un radical aminoalcoxy ou un groupement  $-Y-Z$ ,

10 - L représente un atome d'oxygène ou de soufre ou un groupement  $-NH-$ ,

- J représente un atome d'hydrogène ou un radical hydroxy, et

- n représente un nombre entier qui peut être égal à zéro, étant entendu que,

15 - lorsque L représentant un atome de soufre ou un groupement  $-NH-$ , les radicaux R et R', identiques ou différents, représentent chacun un atome d'hydrogène ou un groupement  $-Y-Z$  ou  $Y'-Z'$  dans lequel Y et Y', identiques ou différents, représentent chacun un radical alcoylène droit ou ramifié ( $-alk-$ ) ou un radical

20  $\begin{array}{c} E \\ | \\ -P-S^- \\ || \\ O \end{array}$ ,  $\begin{array}{c} E \\ | \\ -P-O-alk- \\ || \\ O \end{array}$ ,  $\begin{array}{c} E \\ | \\ -P-S-alk \\ || \\ O \end{array}$  ou  $\begin{array}{c} E \\ | \\ -P-alk- \\ || \\ O \end{array}$  dans lequel E a les mêmes significations que X, ou un radical  $-alk-O-alk-$  ou un radical

25  $-alk-CO-NH-alk-$  ou un radical  $\begin{array}{c} E \\ | \\ -P-O-alk-NH-CO-alk- \\ || \\ O \end{array}$  ou un radical

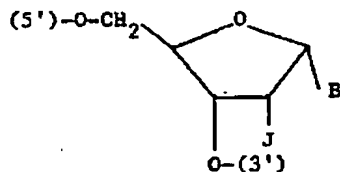
$\begin{array}{c} E \\ | \\ -P-O-alk-CO-NH-alk- \\ || \\ O \end{array}$ , et Z et Z', identiques ou différents, représen-

30 tent chacun un radical correspondant à un agent d'intercalation ou un radical porteur d'une fonction qui réagit directement ou indirectement avec les chaînes de nucléotides ou un radical dont la présence permet une détection facile,

- lorsque L représentant un atome d'oxygène, les radicaux R et R', identiques ou différents, représentant chacun un atome d'hydrogène ou un groupement -Y-Z- ou Y'-Z' dans lequel Y, Y', Z et Z' sont définis comme précédemment, étant entendu que l'un au moins des radicaux R et R' contient un radical intercalant ou un radical chimique réactif,

- lorsque L représentant un atome d'oxygène, R et R' représentent chacun un atome d'hydrogène et B représente une base nucléique modifiée activable.

Il est entendu que, dans ce qui précède et ce qui suit, les  $\alpha$ -D-nucléosides ( $\alpha$ -B) correspondent à la représentation suivante :



La formule générale (I) représente un enchaînement d' $\alpha$ -D-nucléotides identiques ou différents et le nombre  $n+2$  indique le nombre d' $\alpha$ -D-nucléosides contenus dans la molécule. De préférence,  $n$  est compris entre 1 et 50 et, plus particulièrement entre 1 et 25.

Les produits de formule générale (I) seront désignés par la suite par l'expression  $\alpha$ -D-oligonucléotides afin de préciser que les éléments constitutifs sont des  $\alpha$ -D-nucléosides et non pas des  $\beta$ -D-nucléosides qui sont présents dans les acides nucléiques naturels.

Les agents d'intercalation sont des produits connus dans les techniques relatives aux acides nucléiques ; ce sont des composés capables de "s'intercaler" dans la structure des ADN ou des ARN, c'est-à-dire capables de s'insérer entre les plateaux de base des acides nucléiques.

Les agents d'intercalation sont généralement choisis parmi les composés polycycliques ayant une configuration plane tels que l'acridine et ses dérivés, la furocoumarine et ses dérivés, la daunomycine et les autres dérivés de l'anthracycline, la 1,10-phé-  
5 nanthroline, la phénanthridine et ses dérivés, la proflavine, les porphyrines, les dérivés du dipyrido [1,2-a : 3',2'-d] imidazole, l'ellipticine ou l'ellipticinium et leurs dérivés et le diazapyrène et ses dérivés.

Les radicaux chimiques réactifs sont des radicaux pouvant  
10 réagir directement ou indirectement avec une chaîne de nucléotides pour former une liaison covalente ou pour la modifier chimiquement ou pour la couper. De préférence, ces radicaux chimiques réactifs sont activables, par exemple, par voie chimique, biochimique ou photochimique.

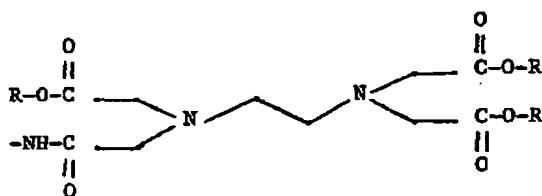
15 Les radicaux réactifs activables sont généralement choisis parmi l'acide éthylène-diamine-tétraacétique, l'acide diéthylène-triamine-pentaacétique, les porphyrines, la 1,10-phénanthroline, l'azido-4 acétophénone, l'éthylène-imine, la  $\beta$ -chloroéthylamine et leurs dérivés, et les composés aromatiques absorbant les radiations  
20 du proche ultra-violet ou du visible ou pouvant réagir chimiquement avec les constituants nucléiques.

Plus particulièrement, les radicaux chimiquement activa-  
bles en présence d'ions métalliques, d'oxygène et d'un agent réduc-  
25 teur (acide éthylène-diamine-tétraacétique, acide diéthylène-triamine-pentaacétique, porphyrine, phénanthroline) induisent la coupure dans des séquences d'acides nucléiques situées dans leur voisinage.

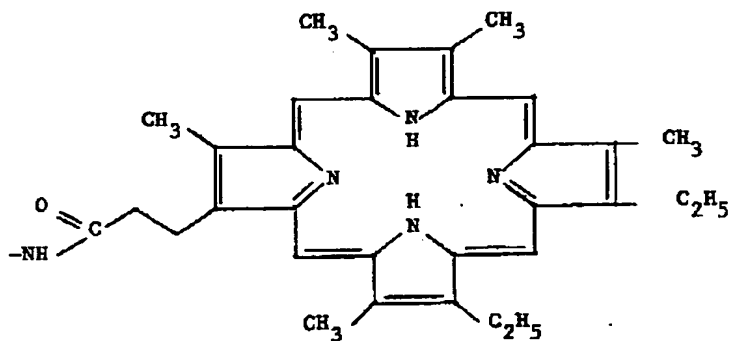
Par irradiation dans le domaine du visible ou du proche  
ultra-violet, il est possible d'activer les dérivés qui absorbent  
ces radiations et de réaliser des réactions de pontage ou des  
30 réactions photo-induites (coupure et modification des bases nucléi-  
ques) des acides nucléiques sur lesquels est fixé l' $\alpha$ -D-oligonucléo-  
tide porteur du groupement activable.

Parmi les radicaux Z et Z' peuvent être plus particulièrement cités :

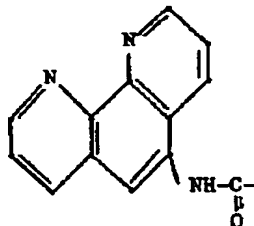
- les radicaux dérivés de l'acide éthylène-diamine-tétraacétique de formule :



- les radicaux dérivés de l'acide diéthylène-triamine-pentaacétique,
- les radicaux dérivés de la méthylpyrroporphyrine de formule :



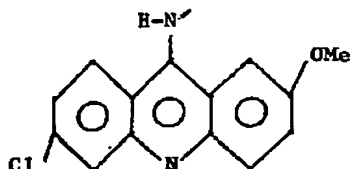
- les radicaux dérivés de la phénanthroline de formule :



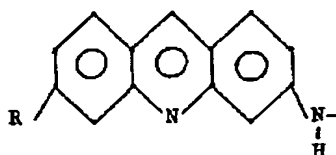
607507

7

- les radicaux dérivés de l'acridine

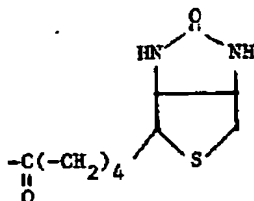


- les radicaux dérivés de la proflavine

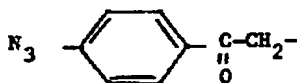


R représentant un groupement amino ( $\text{NH}_2$ ) ou azido ( $\text{N}_3$ )

- les radicaux dérivés de la biotine



- les radicaux dérivés de l'azido-4 acétophénone de  
formule :





Le radical B est, de préférence, choisi parmi les bases nucléiques naturelles (thymine, adénine, cytosine, guanine, uracile) mais il est possible d'utiliser des bases nucléiques modifiées. Peuvent être cités l'amino-2 adénine et ses dérivés substitués, par exemple, sur l'atome d'azote N<sup>6</sup> par un radical aminoalkylène ou par un radical azidophénylalkylène, la guanine substituée sur l'atome d'oxygène O<sup>6</sup>, par exemple, par un groupement ( $\omega$ -alkylène)-9-acridine, la ( $\omega$ -aminoalkyl)-amino-8-adénine et ses dérivés substitués sur le radical amino en  $\omega$  par un groupe acridine, ou les dérivés halogénés ou azidés tels que le bromo-5 uracile, l'azido-8 adénine, la 7-déazaadénine, la 7-déazaguanine. Il est possible également d'utiliser des dérivés des bases nucléiques comportant un groupement intercalant ou un groupement chimiquement ou photochimiquement activable.

De préférence, le radical X représente un oxoanion. Cependant, le radical X peut représenter un radical alkyle contenant 1 à 7 atomes de carbone (méthyle, éthyle, propyle), un radical alcoxy dont la partie alkyle contient 1 à 7 atomes de carbone (méthoxy, éthoxy, diméthyl-2,2 propyloxy), un radical aminoalkyle ou aminoalcoxy de formule générale R<sub>1</sub>R<sub>2</sub>N-alk-A- dans laquelle A représente une liaison ou un atome d'oxygène, -alk- représente un radical alkylène contenant 1 à 10 atomes de carbone et R<sub>1</sub> et R<sub>2</sub>, identiques ou différents, représentent un atome d'hydrogène ou un radical alkyle contenant 1 à 7 atomes de carbone ou forment ensemble avec l'atome d'azote auquel ils sont liés un hétérocycle azoté saturé à 5 ou 6 chaînons, étant entendu que le groupement R<sub>1</sub>R<sub>2</sub>N- peut être quaternarisé, ou un radical alcoylthio dont la partie alcoyle contient 1 à 7 atomes de carbone.

La présente invention concerne également les produits de formule générale (I) sous forme de sels avec des bases ou des acides minéraux ou organiques, sous forme racémique ou sous forme d'isomères R ou S optiquement actifs purs ou en mélange.

Parmi les produits de formule générale (I) plus particulièrement intéressants peuvent être cités :  $\alpha\text{--}[(\text{Tp})_n\text{T}](\text{Y}_1)\text{Z}_1$  ;  $\text{Z}_2(\text{Y}_2)\alpha\text{--}[(\text{Tp})_n\text{T}]$  ;  $\text{Z}_2(\text{Y}_2)\alpha\text{--}[(\text{Tp})_n\text{T}](\text{Y}_1)\text{Z}_1$  ;  $\text{Z}_2(\text{Y}_2)\alpha\text{--d}(\text{CpCpTpTpApTpApTpT})$  où A est un radical  $\alpha\text{--D--désoxyadénosine}$ , C est un radical  $\alpha\text{--D--désoxycytidine}$ , T est le radical  $\alpha\text{--D--thymidine}$ , n est un nombre entier compris entre 1 et 25 et  $\text{Y}_1$  et  $\text{Y}_2$  représentent un radical alcoylène contenant 1 à 10 atomes de carbone et  $\text{Z}_1$  et  $\text{Z}_2$  représentent chacun un dérivé de l'acridine ou un dérivé de la proflavine ou un dérivé de la 1,10-phénanthroline ou un dérivé de l'azido-4 acétophénone ou un dérivé de l'EDTA ou un dérivé de la biotine.

Les nouveaux produits de formule générale (I) peuvent être préparés par voie chimique par des procédés connus et, en particulier, ceux qui sont décrits dans les demandes de brevets français FR 8301223 (2 540 122) et FR 8411795 (2 568 254).

Selon la présente invention, on peut préparer les dérivés totalement protégés et éliminer les groupements protecteurs. Les produits de formule générale (I) peuvent aussi être obtenus en préparant, dans une première étape, les dérivés non protégés comportant, par exemple, un groupement thiophosphate à l'une des extrémités 3' ou 5' ou aux deux extrémités 3' et 5' de la chaîne d' $\alpha\text{--D--oligonucléotides}$  puis en condensant le ou les groupe(s) thiophosphate(s) avec les dérivés 2 et/ou 2' porteurs d'un groupement halogénoalkyle ou d'un groupement ester alkylé d'un acide sulfonique.

Les produits selon la présente invention sont constitués d'une chaîne d' $\alpha\text{--D--oligonucléotides}$  liée de façon covalente à un agent intercalant ou à un groupe chimique réactif ou à un agent intercalant et un groupe chimique réactif. Dans ces nouveaux produits, l' $\alpha\text{--D--oligonucléotide}$  assure la reconnaissance de la séquence d'acide nucléique complémentaire, l'agent intercalant augmente fortement la stabilité du complexe d'hybridation et le groupe chimique réactif conduit, par activation, à une réaction de pontage

ou à une modification chimique ou à une coupure de la chaîne d'acides nucléiques complémentaires. Ces nouveaux produits permettent donc d'induire des réactions de pontage, de modifier ou de couper avec une grande efficacité une chaîne d'acides nucléiques en un site déterminé préalablement choisi.

Les nouveaux produits de formule générale (I) selon l'invention et les produits de formule générale (I) dans laquelle L représente un atome d'oxygène, R et R' représentent chacun un atome d'hydrogène et B représente une base nucléique naturelle forment des complexes d'hybridation avec les séquences complémentaires d'ARN beaucoup plus stables que ceux qui sont formés avec l'ADN. La stabilité peut être mesurée par la température de demi-transition des complexes ( $T_{1/2}$ ) lors d'une élévation de température. Les valeurs de  $T_{1/2}$  sont déterminées à la concentration de  $10^{-5}$  M en  $\alpha$ -D-oligonucléotide dans un tampon à pH = 7 contenant du cacodylate de sodium ( $10^{-2}$  M) et du chlorure de sodium (0,1 M). Les résultats sont rassemblés dans les Tableaux I et II.

Cette différence de stabilité des complexes d'hybridation (Tableau I) permet une inhibition préférentielle des ARNs messagers et des ARNs viraux sans risque important de provoquer des effets indésirables au niveau de l'ADN du génome.

De plus, vis-à-vis des ARNs, les produits selon l'invention forment généralement des complexes plus stables que ceux qui sont obtenus à partir des dérivés des  $\beta$ -D-nucléosides naturels.

Selon les résultats du tableau II, les hybrides formés entre les dérivés  $\alpha$ -D-oligonucléotides de l'invention et les séquences d'acide nucléique comportant une disposition de bases complémentaires sont beaucoup plus stables lorsque les deux brins possèdent la même orientation que lorsqu'ils sont antiparallèles. On entend donc par séquences d'acide nucléique complémentaires aux dérivés  $\alpha$ -D-oligonucléotides de l'invention des portions d'acide nucléique comportant des séquences de bases complémentaires et orientées dans le même sens que les  $\alpha$ -D-oligonucléotides.

Les nouveaux produits de formule générale (I) selon l'invention et les produits de formule générale (I) dans laquelle L représente un atome d'oxygène, R et R' représentent chacun un atome d'hydrogène et B représente une base nucléique naturelle, qui possèdent la propriété de se fixer fortement sur la séquence nucléique complémentaire, peuvent être utilisés comme sondes pour détecter la présence d'une chaîne de nucléotides complémentaires. Cette détection est facilitée par la présence d'un groupe fluorescent ou d'un groupe biotine dans ces molécules.

Un autre objet de la présente invention concerne l'application des nouveaux produits de formule générale (I) selon l'invention et des produits de formule générale (I) dans laquelle L représente un atome d'oxygène, R et R' représentent chacun un atome d'hydrogène et B représente une base nucléique naturelle au blocage spécifique de gènes cellulaires ou d'agents pathogènes préalablement choisis (virus, bactéries, parasites). De par leur configuration, les  $\alpha$ -D-oligonucléotides selon l'invention sont beaucoup plus résistants vis-à-vis des nucléases que les dérivés de  $\beta$ -D-nucléosides naturels. Cette stabilité vis-à-vis de l'hydrolyse enzymatique permet l'utilisation des produits de formule générale (I) dans des expérimentations in vivo ou in vitro en présence de nucléases. De ce fait les  $\alpha$ -D-oligonucléotides selon l'invention présentent des avantages incontestables sur les dérivés de  $\beta$ -D-nucléosides déjà connus.

Les nouveaux produits de formule générale (I) selon l'invention et les produits de formule générale (I) dans laquelle L représente un atome d'oxygène, R et R' représentent chacun un atome d'hydrogène et B représente une base nucléique naturelle sont particulièrement utiles comme médicaments permettant de bloquer les gènes indésirables exogènes (virus, bactéries, parasites) ou endogènes (gènes cellulaires, oncogènes). L'expression de ces gènes peut être bloquée en agissant soit directement sur l'ADN ou l'ARN porteur de l'information génétique soit sur l'ARN messager, copie du gène, en bloquant alors toute traduction par hybridation ou par hybridation puis pontage ou modification ou coupure de l'ARN messager ou viral choisi comme cible.

Ce blocage peut être réalisé en utilisant un produit de formule générale (I) selon l'invention ou un produit de formule générale (I) dans laquelle L représente un atome d'oxygène, R et R' représentent chacun un atome d'hydrogène et B représente une base nucléique naturelle dont la séquence est complémentaire de celle d'une région non complexée d'un ARN ou d'un ADN et, en particulier, d'un ARN messenger. L'hybridation, suivie ou non du pontage, de la modification ou de la coupure de l'ARN messenger ou viral, empêche la synthèse de l'ARN ou de la protéine correspondante ou l'expression des fonctions virales ou parasitaires.

Si cet ARN ou cette protéine est vital pour le virus, la bactérie ou le parasite, les produits de formule générale (I) selon l'invention et les produits de formule générale (I) dans laquelle L représente un atome d'oxygène, R et R' représentent chacun un atome d'hydrogène et B représente une base nucléique naturelle constitueront des médicaments à activité antivirale, antibactérienne ou antiparasitaire.

Si cet ARN ou cette protéine n'est pas vital pour l'organisme, il est possible d'en supprimer sélectivement les effets. Dans ce cas, les produits de formule générale (I) selon l'invention et les produits de formule générale (I) dans laquelle L représente un atome d'oxygène, R et R' représentent chacun un atome d'hydrogène et B représente une base nucléique naturelle constitueront soit des médicaments à activité antitumorale lorsque le gène visé ou son ARN messenger code pour une protéine impliquée dans la transformation cellulaire, soit des médicaments capables de supprimer la caractéristique de résistance aux antiviraux, aux antibiotiques ou aux antiparasitaires lorsque la protéine codée est responsable de l'inactivation des antibiotiques, des antiviraux ou des antiparasitaires.

Des effets cytotoxiques spécifiques peuvent être obtenus par action d'un produit selon l'invention ou d'un produit de formule générale (I) dans laquelle L représente un atome d'oxygène, R et R' représentent chacun un atome d'hydrogène et B représente une base naturelle sur une fonction cellulaire indispensable à la cellule cible.

Les produits selon la présente invention et les produits de formule générale (I) dans laquelle L représente un atome d'oxygène, R et R' représentent chacun un atome d'hydrogène et B représente une base nucléique naturelle peuvent également être utilisés pour accroître la synthèse d'un ARN ou d'une protéine en agissant sur un gène de régulation du gène codant pour l'ARN ou pour la protéine.

Les produits selon la présente invention, qui possèdent la propriété de se fixer fortement sur la séquence nucléique complémentaire puis d'induire le pontage, la modification ou la coupure de la chaîne d'acides nucléiques en un site déterminé, sont utilisables comme réactifs spécifiques de séquences et, plus particulièrement, comme nucléases artificielles. Ils peuvent être utilisés comme réactifs en biologie moléculaire ou en génie génétique. Ils peuvent être également utilisés pour obtenir des fragments d'acides nucléiques, en particulier des fragments d'ARNs pour lesquels il n'existe pas de nucléase spécifique de séquences.

TABLEAU I

		(T 1/2)°C									
(1)	SEQUENCE COMPLEMENTAIRE										
		$\alpha$ -(Tp) <sub>8</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> -Acr	Acr(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> $\alpha$ -(pT) <sub>8</sub>	$\alpha$ -(Tp) <sub>7</sub>	$\beta$ -(Tp) <sub>8</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> Acr	Acr(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> $\beta$ -(pT) <sub>8</sub>	$\beta$ -(Tp) <sub>8</sub>				
	Polyr(A)	38		37,5	22,5	36,4	28,5				11
	Polyd(A)	25		25	$\leq 10$	34,4	26,4				13
	r(Ap) <sub>7</sub> A	29,6		35,6	23	29	14,8				$\leq 10$
	d(pA) <sub>8</sub>	$\leq 10$		28,4	$\leq 10$	24,8	14,6				$\leq 10$

Températures de demi-transition (T 1/2) des complexes formés entre les dérivés (1) et les séquences d'acides nucléiques complémentaires (anomères  $\beta$ ), déterminées à la concentration de  $10^{-5}$  M en  $\alpha$ -D-oligonucléotide et avec le rapport [thymine/adénine]=1 dans le tampon 10 mM cacodylate de sodium/0,1 M NaCl à pH=7.

TABLEAU II

	(T 1/2)°C	
(1)		
$\beta$ -d-oligonucléotide		$\alpha$ -d' (GpCpTpApTpApTp) 3' Ar
$\beta$ -d' (ApCpGpApTpApTpApCp) 3'	35	$\alpha$ -d' (GpCpTpApTpApTp) 3' Ar
$\beta$ -d' (ApCpGpApTpApTpApCp) 5'	19	

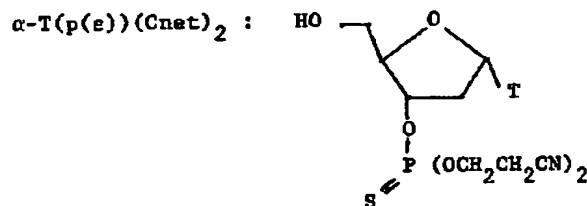
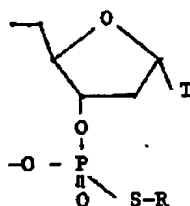
Températures de demi-transition (T 1/2) des complexes formés entre les dérivés (1) et les  $\beta$ -d-oligonucléotides dont la disposition de bases complémentaires est orientée parallèlement ou antiparallèlement à celle des composés (1), déterminées à la concentration de  $10^{-5}$  M en  $\alpha$ -D-oligonucléotides et en  $\beta$ -D-oligonucléotides dans le tampon 10 mM cacodylate de sodium / 0,1 M NaCl, pH=7 ; Ar=p-Cl C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>.



Les exemples suivants, données à titre non limitatif, illustrent la présente invention.

Dans la description et les exemples, les abréviations suivantes sont utilisées :

- 5             $\alpha$ -dA        :  $\alpha$ -D-2'-désoxyadénosine  
               $\alpha$ -dbzA    : N-benzoyl- $\alpha$ -D-2'-désoxyadénosine  
               $\alpha$ -dC        :  $\alpha$ -D-2'-désoxycytidine  
               $\alpha$ -dbzC    : N-benzoyl- $\alpha$ -D-2'-désoxycytidine  
               $\alpha$ -dG        :  $\alpha$ -D-2'-désoxyguanosine  
 10            $\alpha$ -dibG    : N-isobutyryl- $\alpha$ -D-2'-désoxyguanosine  
               $\alpha$ -T        :  $\alpha$ -D-thymidine  
               $\alpha$ -Tbz     :  $\alpha$ -D-thymidine 3'-benzoyle  
               $\alpha$ -I(sp)T] :  $\alpha$ -D-thymidine 5'-thiophosphate  
               $\alpha$ -T(ps)    :  $\alpha$ -D-thymidine 3'-thiophosphate  
 15            $\alpha$ -T(ps)R    : HO

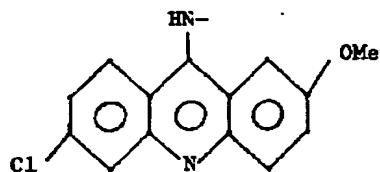


- 20           ABH        : acide benzohydroxamique  
              Cnet     :  $\beta$ -cyanoéthyle  
              DBU       : diaza-1,8 bicyclo[5,4,0] undécane-7  
              Et        : éthyle  
              Me        : méthyle  
              MST     : mésitylènesulfonyltétrazolide  
              p        : phosphoester  
              p        : p-chlorophénylphosphoester

2607507

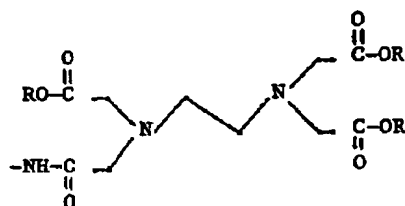
17

Acr :

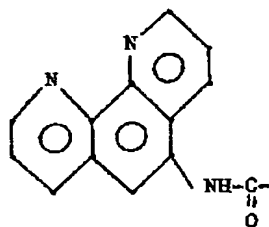


EDTA : R=H

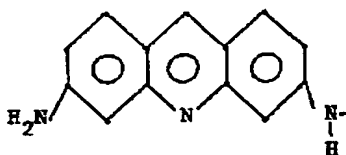
EDTAMe<sub>3</sub> : R=CH<sub>3</sub>



Pha :



Prof :



CCM : chromatographie sur couche mince sur gel de silice

Système A : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, MeOH (90-10, v/v)

Système B : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, MeOH (85-15, v/v)

EXEMPLE I :  $\alpha$ -(TpTpTpTpTpTpTp)(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>Acr1) 5'-O-(diméthoxytrityl) $\alpha$ -thymidine

A une solution de  $\alpha$ -thymidine (3,6 g) dans la pyridine anhydre (15 cm<sup>3</sup>), on ajoute sous agitation 5,35 g de chlorure de diméthoxytrityle. Après 4 heures de réaction à la température ambiante on détruit l'excès de chlorure de diméthoxytrityle par addition de méthanol (3 cm<sup>3</sup>). On évapore le solvant sous pression réduite ; le résidu est repris avec du chloroforme. La phase organique est lavée avec de l'eau puis séchée et concentrée. Le produit est purifié par chromatographie sur gel de silice. Rendement  $\approx$  80 %.

2) 5'-O-(diméthoxytrityle) $\alpha$ -thymidine 3'-(p-chlorophénylphosphate) de pyridinium

On ajoute sous agitation, à -20°C, 3 équivalents de méthyl p-chlorophényl chlorophosphate à une solution de 9 équivalents de diméthyl-1,5-tétrazole dans la pyridine anhydre ; l'addition terminée, on continue l'agitation pendant une heure à la température ambiante, puis ajoute une solution de 1 équivalent de 5'-O-(diméthoxytrityle) $\alpha$ -thymidine dans la pyridine. Après quelques heures de réaction à la température ambiante, on ajoute alors de l'eau glacée et extrait le diester avec du chloroforme. La solution chloroformique est séchée et concentrée sous pression réduite. Le diester obtenu sous forme de solution dans la pyridine est pratiquement pur pour être utilisé dans les étapes suivantes. CCM (système B) : Rf=0,18.

3)  $\alpha$ -thymidine 3'-(p-chlorophényl  $\beta$ -cyanoéthylphosphate)

A une solution de (Dmtr) $\alpha$ -T(1 mmole) et de p-chlorophényl  $\beta$ -cyanoéthylphosphate de triméthylammonium (2 mmoles) dans la pyridine anhydre (10 cm<sup>3</sup>), on ajoute à la température ambiante et sous agitation du chlorure de mésitylène sulfonyle (3 mmoles) et du tétrazole (6 mmoles). L'évolution de la réaction est suivie par CCM (système A). Lorsque la réaction est terminée, l'excès de chlorure de mésitylène sulfonyle est détruit par addition d'eau glacée.

Le triester est extrait avec du chloroforme. La phase organique est lavée avec une solution saturée de bicarbonate de sodium puis avec de l'eau, séchée et concentrée. Le résidu obtenu est traité ensuite, pendant 15 minutes, à 0°C, avec 15 cm<sup>3</sup> d'acide benzène sulfonique [solution à 2 % dans CHCl<sub>3</sub>-MeOH (7-7, v/v)] puis la solution est neutralisée avec une solution de bicarbonate de sodium. Le produit est extrait avec du chloroforme, la phase organique est lavée avec de l'eau glacée, séchée et évaporée. Le résidu obtenu est purifié sur une colonne de gel de silice (éluant : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH). CCM (système A) Rf ≈ 0,27 ; rendement : 70 %.

4) (Dmtr)α-(TβTβ)Cnet

On fait réagir sous agitation pendant 2 heures à la température ambiante une solution de 0,6 mmole de (Dmtr)α-Tβ (exemple I-2), de 0,5 mmole de α-Tβ Cnet (exemple I-3) et de 1,5 mmole de mésitylènesulfonyltétrazolide (MST) dans 4,5 cm<sup>3</sup> de pyridine anhydre ; on ajoute ensuite 0,5 cm<sup>3</sup> d'eau glacée et continue l'agitation pendant 30 minutes. On concentre la solution sous pression réduite. Le résidu est repris avec du chloroforme ; la phase organique est lavée avec une solution aqueuse à 5 % de NaHCO<sub>3</sub> puis séchée et évaporée sous pression réduite. Le produit est purifié sur une colonne de gel de silice (éluant : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH). CCM (système A) : Rf=0,50 et 0,52 ; rendement ≈ 72 %.

5) (Dmtr)α-(TβTβ)

On fait réagir pendant 2 heures à la température ambiante une solution de (Dmtr)α-(TβTβ)Cnet (0,3 mmole) (exemple I-4) et de 1 cm<sup>3</sup> de triéthylamine dans la pyridine (2 cm<sup>3</sup>). On chasse les produits volatils sous pression réduite puis précipite le diester par agitation dans l'éther. CCM (système B) : Rf=0,19.

6) (Dmtr)α-(Tβ)<sub>4</sub>Cnet

La composé (Dmtr)α-(Tβ)<sub>2</sub>Cnet (0,2 mmole) est traité avec l'acide benzène sulfonique à 0°C pendant 15 minutes. Le mélange est repris avec 40 cm<sup>3</sup> de chloroforme. La phase organique est lavée avec une solution aqueuse de NaHCO<sub>3</sub> puis séchée sur Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> et

concentrée sous pression réduite. Au résidu obtenu on ajoute 0,25 mmole de (Dmtr) $\alpha$ -(TpTp). Après avoir séché le mélange par co-évaporation avec le pyridine anhydre, on ajoute 3 cm<sup>3</sup> de pyridine anhydre puis 0,6 mmole de MST et laisse le mélange réactionnel à la température ambiante pendant 2 heures. On détruit l'excès de réactif de couplage par addition d'eau glacée puis termine la préparation comme dans l'exemple I-4.

7) (Dmtr) $\alpha$ -(Tp)<sub>8</sub>Cnet

En remplaçant la dinucléotide (Dmtr) $\alpha$ -(Tp)<sub>2</sub>Cnet par le tétranucléotide (Dmtr) $\alpha$ -(Tp)<sub>4</sub>Cnet et en opérant comme dans I-5 et I-6 on obtient l'octanucléotide totalement protégé.

8) (Dmtr) $\alpha$ -(Tp)<sub>8</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>Acr

(Dmtr) $\alpha$ -(Tp)<sub>8</sub>Cnet (0,01 mmole) est traité pendant 2 heures à la température ambiante avec 0,3 cm<sup>3</sup> d'une solution de pyridine-triéthylamine (2-1, v/v). On chasse le solvant sous pression réduite et lave le diester obtenu sous forme de solide avec de l'éther puis le sèche sous pression réduite. Le diester est ensuite couplé avec 0,02 mmole de méthoxy-2 chloro-6 ( $\alpha$ -hydroxypentylamino)-9 acridine en présence de MST (0,04 mmole) dans la pyridine anhydre ; on termine ensuite la préparation comme dans l'exemple I-4.

9)  $\alpha$ -(Tp)<sub>8</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>Acr

L'octanucléotide (Dmtr) $\alpha$ -(Tp)<sub>8</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>Acr est traité pendant 24 heures à la température ambiante avec une solution molaire en acide benzohydroxamique (ABH) et en diaza-1,8 bicyclo (5,4,0) endécène-7 (DBU) dans la pyridine anhydre (en utilisant 10 équivalents de ABH-DBU par équivalent de phosphotriester arylé à déprotéger). Le milieu réactionnel est neutralisé avec du DOWEX 50 (forme pyridinium) et évaporé sous pression réduite. Le résidu est ensuite traité avec l'acide acétique à 80 % pendant quelques heures à la température ambiante puis l'acide acétique est éliminé par co-évaporation plusieurs fois avec de l'éthanol. On reprend le résidu avec de l'eau, lave la phase aqueuse avec de l'éther puis purifie le produit par HPLC. Le temps de rétention du produit purifié est donné dans le tableau III.

EXEMPLE II :  $[\text{Acr}(\text{CH}_2)_5]\alpha\text{-(pT)}_8$ 1)  $\alpha\text{-thymidine 3'-benzoyl}, \alpha\text{-Tbz}$ 

A une solution de  $(\text{Dmtr})\alpha\text{-T}$  (1 mmole) dans la pyridine anhydre, on ajoute sous agitation à la température ambiante du chlorure de benzoyle (1,5 mmole) puis laisse le mélange réactionnel pendant 48 heures à la température ambiante. On détruit l'excès de chlorure de benzoyle par addition d'eau glacée puis termine la préparation comme dans l'exemple I-3. CCM (système A) :  $R_f \approx 0,36$  ; rendement  $\approx 75\%$ .

2)  $(\text{Dmtr})\alpha\text{-(TpT)}\text{bz}$ 

On opère comme dans l'exemple I-4 en remplaçant  $1'\alpha\text{-Tp-Cnet}$  par le composé  $\alpha\text{-Tbz}$ . On obtient le dinucléoside monophosphate protégé.

3)  $(\text{Dmtr})\alpha\text{-(Tp)}_3\text{Tbz}$ 

En remplaçant le dinucléotide  $(\text{Dmtr})\alpha\text{-(Tp)}_2\text{Cnet}$  par le composé  $(\text{Dmtr})\alpha\text{-(TpT)}\text{bz}$  et en opérant selon l'exemple I-6, on obtient le tétranucléosidetriphosphate protégé.

4)  $(\text{Dmtr})\alpha\text{-(Tp)}_7\text{Tbz}$ 

Le composé  $(\text{Dmtr})\alpha\text{-(Tp)}_3\text{Tbz}$  (1 équivalent) est détritylé par l'acide benzène sulfonique ; le mélange est repris avec du chloroforme et lavé avec une solution aqueuse de  $\text{NaHCO}_3$  puis séché et concentré. A ce résidu on ajoute 1,2 équivalents de  $(\text{Dmtr})\alpha\text{-(Tp)}_4$  (préparé par décycanoéthylation du composé  $(\text{Dmtr})\alpha\text{-(Tp)}_4\text{Cnet}$  selon l'exemple I-5). Après avoir séché le mélange par co-évaporation avec la pyridine, on ajoute à la solution de pyridine 3 équivalents de MST et laisse le mélange réactionnel sous agitation pendant 2 heures à la température ambiante. On termine la préparation comme dans l'exemple I-6.

5)  $\alpha\text{-(Tp)}_7\text{Tbz}$ 

Le composé de l'exemple II-4 est traité pendant 15 minutes à  $0^\circ\text{C}$  avec l'acide benzène sulfonique [2 % en solution dans le chloroforme-méthanol (7-3, v/v)]. Le mélange est repris avec du chloroforme. La solution chloroformique est lavée avec une solution aqueuse de  $\text{NaHCO}_3$  puis séchée et évaporée sous pression réduite. Le résidu obtenu est utilisé dans l'étape suivante.

6)  $\alpha$ -[ $\beta$ (Tp)<sub>7</sub>T]bz

On ajoute sous agitation et à -20°C, 6 équivalents de méthyl p-chlorophényl chlorophosphate dans la pyridine anhydre. L'addition terminée, on continue l'agitation pendant 1 heure à la température ambiante puis ajoute une solution de 1 équivalent de  $\alpha$ -[ $\beta$ (Tp)<sub>7</sub>T]bz. Après 2 heures de réaction à la température ambiante, on ajoute de l'eau glacée puis extrait le produit avec du chloroforme.

7) [Acr(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>] $\alpha$ -[ $\beta$ (Tp)<sub>7</sub>T]bz

On fait réagir pendant 2 heures à la température ambiante une solution de méthoxy-2 chloro-6 ( $\alpha$ -hydroxypentylamino)-9 acridine (2 équivalents), de  $\alpha$ -[ $\beta$ (Tp)<sub>7</sub>T]bz (1 équivalent) et de MST (3 équivalents) puis termine la préparation comme dans l'exemple I-4.

8) [Acr(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>] $\alpha$ -(pT)<sub>8</sub>

L'oligonucléotide protégé (exemple II-7) est traité pendant 48 heures sous agitation à la température ambiante avec une solution molaire en ABH-DBU dans la pyridine anhydre (10 équivalents de ABH-DBU par équivalent de phosphoester arylé à déprotéger). A ce mélange, on ajoute 2 volumes d'une solution de soude 0,4 M puis continue l'agitation pendant 1 heure à la température ambiante. Après avoir neutralisé le milieu réactionnel avec l'acide chlorhydrique, on lave la phase aqueuse avec de l'éther puis purifie l'oligonucléotide déprotégé par HPLC (le temps de rétention est donné dans le tableau III).

Et

EXEMPLE III : [Acr(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub><sup>Et</sup>N(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>] $\alpha$ -[(sp)(Tp)<sub>7</sub>T]1) Bis-( $\beta$ -cyanoéthyl)-diisopropylamino-phosphite

A une solution de  $\beta$ -cyanoéthanol (15 cm<sup>3</sup>) et de triméthylamine (20 g) dans le mélange d'éther (100 cm<sup>3</sup>) et de benzène (50 cm<sup>3</sup>), on ajoute goutte à goutte à -5°C et sous agitation une solution de 20 g de dichloro diisopropylamino-phosphite dans 40 cm<sup>3</sup>

de benzène. L'addition terminée on continue l'agitation pendant 1 heure à la température ambiante puis élimine le chlorohydrate de triméthylammonium par filtration. On chasse le solvant sous pression réduite et purifie le produit par évaporation sur couche mince (distillation moléculaire).

2)  $\alpha-[(\text{Cnet})_2((\text{s})\text{p})(\text{Tp})_7\text{T})\text{bz}$

A une solution anhydre de  $\alpha-[(\text{Tp})_7\text{T})\text{bz}$  (1 équivalent) et de tétrazole (10 équivalents) dans le mélange de solvant  $\text{CH}_3\text{CN}-\text{DMF}$  (50-50, v/v) on ajoute sous atmosphère d'argon et sous agitation une solution de bis-( $\beta$ -cyanoéthyl)-diisopropylamino-phosphite (5 équivalents) dans l'acétonitrile. Après 30 minutes à la température ambiante, on ajoute au mélange réactionnel une suspension de soufre (50 équivalents) dans la pyridine puis continue l'agitation pendant 90 minutes à 30°C. On élimine l'excès de soufre par filtration, chasse les solvants sous pression réduite puis reprend le résidu avec du toluène ; la phase organique est lavée avec une solution aqueuse de  $\text{NaHCO}_3$  puis séchée et concentrée. Le produit est purifié par chromatographie sur gel de silice.

3)  $\alpha-[(\text{sp})(\text{Tp})_7\text{T}]$

L'octanucléotide préparé selon l'exemple III-2 est traité pendant 48 heures à la température ambiante avec une solution molaire en ABH et DBU (10 équivalents de ABH-DBU par équivalent de phosphotriester) puis avec 2 volumes d'une solution aqueuse de soude 0,6 M pendant 24 heures. On neutralise le milieu réactionnel avec l'acide chlorhydrique, lave la phase aqueuse avec l'éther et purifie le produit par HPLC. Le temps de rétention du produit est donné dans le tableau III.

4)  $[\text{Acr}(\text{CH}_2)_3\overset{\text{Et}}{\underset{|}{\text{N}}}(\text{CH}_2)_2]\alpha-[(\text{sp})(\text{Tp})_7\text{T}]$

On fait réagir pendant 5 heures à la température ambiante une solution de  $\alpha-[(\text{sp})(\text{Tp})_7\text{T}]$  (1 équivalent) et de méthoxy-2 chloro-6[N-( $\beta$ -chloroéthyl, éthylamino)-3 propylamino]-9 acridine (4 équivalents) dans un mélange  $\text{DMSO}-\text{H}_2\text{O}-\text{NaHCO}_3$  à 5 % dans l'eau (2-2-1, v/v) puis purifie le produit formé par HPLC. Le tableau III donne le temps de rétention du produit préparé.



EXEMPLE IV : [Prof(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>]α-[(sp)(Tp)<sub>7</sub>T]

Une solution de α-[(sp)(Tp)<sub>7</sub>T] (1 équivalent) et de N-(ω-bromopropyl)proflavine (5 équivalents) dans le mélange de DMSO-H<sub>2</sub>O-NaHCO<sub>3</sub> à 5 % dans l'eau (2-2-1, v/v) est laissée sous agitation pendant 20 heures à la température ambiante ; le produit obtenu est purifié par HPLC. (Le temps de rétention du produit obtenu est donné dans le tableau III.)

EXEMPLE V : (Phe-CH<sub>2</sub>)α-[(sp)(Tp)<sub>7</sub>T]

On opère comme dans l'exemple III-4 en remplaçant le dérivé de l'acridine par la (N-iodoacétylamino)-5 phénanthroline-1,10. Le temps de rétention du produit obtenu est donné dans le tableau III.

EXEMPLE VI : [Acr(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>]α-(pT)<sub>8</sub>(ps)

1) α-thymidine 3'-(bis-cyanoéthylthiophosphate)

En partant de (Dmtr)α-T (1 équivalent), de tétrazole (4 équivalents), de bis-(β-cyanoéthyl)-diisopropylamino-phosphite (2 équivalents) et du soufre (30 équivalents) et en opérant selon l'exemple III-2 on obtient le composé (Dmtr)α-T(p(s))(Cnet)<sub>2</sub> qui est ensuite détritylé par l'acide benzène sulfonique selon l'exemple II-5. Le rendement est de 55 %.

2) (Dmtr)α-[TβT](p(s))(Cnet)<sub>2</sub>

On opère comme dans l'exemple I-4 en remplaçant le composé α-TβCnet par le composé α-T(p(s))(Cnet)<sub>2</sub>. On obtient ainsi le dinucléotide qui est purifié par chromatographie sur silice [éluant : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-H<sub>2</sub>O-Acétone (31-1-68, v/v)]. Le rendement est voisin de 84 %.

3) (Dmtr)α-(Tβ)<sub>6</sub>Cnet

On opère comme dans l'exemple I-6 en remplaçant le dinucléotide (Dmtr)α-(Tβ)<sub>2</sub>Cnet par le tétranucléotide (Dmtr)α-(Tβ)<sub>4</sub>Cnet. On obtient ainsi l'héxanucléotide avec un rendement de 75 %. CCM (système A) : Rf=0,31.

4)  $[\text{Acr}(\text{CH}_2)_5]\alpha-(\beta\text{T})_6\beta$ 

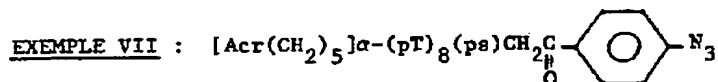
En partant du composé  $(\text{Dmtr})\alpha-(\text{T}\beta)_6\text{Cnet}$  et en opérant selon les exemples II-5, II-6 et II-7, on obtient le composé  $[\text{Acr}(\text{CH}_2)_5]\alpha-(\beta\text{T})_6\beta\text{Cnet}$  qui est ensuite traité avec la triéthylamine selon l'exemple I-5. CCM (système B) :  $\text{RF}=0,44$ .

5)  $[\text{Acr}(\text{CH}_2)_5]\alpha-(\beta\text{T})_8(\text{p(s)})(\text{Cnet})_2$ 

L'octanucléotide est préparé par couplage de l'héxanucléotide  $[\text{Acr}(\text{CH}_2)_5]\alpha-(\beta\text{T})_6\beta$  (1 équivalent) avec le dinucléotide  $\alpha-(\text{T}\beta\text{T})(\text{p(s)})(\text{Cnet})_2$  (1 équivalent) (préparé par détritulation du composé de l'exemple VI-2) en présence de MST (3 équivalents) selon l'exemple I-4. Le produit est purifié sur gel de silice [éluant :  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -MeOH (de 96-4 à 96-14, v/v)].

6)  $[\text{Acr}(\text{CH}_2)_5]\alpha-(\text{pT})_8(\text{ps})$ 

En partant du composé préparé selon l'exemple VI-5 et en opérant selon l'exemple III-3, on obtient l'octanucléotide déprotégé dont le temps de rétention est donné dans le tableau III.



Une solution de  $[\text{Acr}(\text{CH}_2)_5]\alpha-(\text{pT})_8(\text{ps})$  (1 équivalent) et de bromure de 4-azidophénacyle (4 équivalents) dans le mélange de  $\text{DMSO}-\text{H}_2\text{O}-\text{NaHCO}_3$  à 5 % dans l'eau (2-2-1, v/v) est laissée sous agitation pendant une heure à la température ambiante. Le produit de couplage est ensuite purifié par HPLC. Le temps de rétention du produit obtenu est donné dans le tableau III.

25 EXEMPLE VIII :  $[\text{Acr}(\text{CH}_2)_5]\alpha-(\text{pT})_8(\text{ps})\text{CH}_2\text{CO}_2^-$ 

On fait réagir pendant 3 heures à la température ambiante l'acide bromoacétique (6 équivalents) avec l'oligonucléotide  $[\text{Acr}(\text{CH}_2)_5]\alpha-(\text{pT})_8(\text{ps})$  (1 équivalent) selon l'exemple VII puis purifie le produit formé par HPLC. Le temps de rétention du produit obtenu est donné dans le tableau III.

EXEMPLE IX :  $\alpha-(T\beta)_2(CH_2)_6EDTAMe_3$ 

On fait réagir pendant une heure et à la température ambiante une solution de  $(Dmtr)\alpha-(T\beta)_2$  (1 équivalent), de  $Me_3EDTA(-CH_2)_6-OH$  (3 équivalents) et de MST (3 équivalents). On détruit l'excès de réactif de couplage par addition d'eau glacée puis termine la préparation comme dans l'exemple I-3. CCM (système A) :  $R_f \approx 0,4$ .

EXEMPLE X :  $[Acr(CH_2)_5]\alpha-d(pCpCpTpTpApTpApTpT)$ 1)  $(Dmtr)\alpha-d(bzA\beta)$ 

a) Un mélange de 3',5'-di-(p-nitrobenzoyl) $\beta$ -D-thymidine (3,6 mmoles) et de N-benzoyladénine (12 mmoles) dans l'acétonitrile (22 cm<sup>3</sup>) est traité avec le bis-triméthylsilylacétamide (15 mmoles) puis avec du triméthylsilyltrifluorométhanesulfonate (4,7 mmoles) selon T. Yamaguchi et M. Saneyoshi (Chem. Pharm. Bull. 1984, 32, 1441-1450). Le composé 3',5'-di-(p-nitrobenzoyl) $\alpha$ -D-d-(N-benzoyladénosine) [CCM (système A) :  $R_f=0,55$ ] est séparé du dérivé 3',5'-di-(p-nitrobenzoyl) $\beta$ -D-d-(N-benzoyladénosine) [CCM (système A) :  $R_f=0,63$ ] par chromatographie sur plaque préparative de gel de silice.

b) La 3',5'-di-(p-nitrobenzoyl) $\alpha$ -D-d-(N-benzoyladénosine) (1 g) dans le mélange de solvant [dioxanne-MeOH- $CH_2Cl_2$ - $H_2O$ ] (50 cm<sup>3</sup>) est traité à 0°C avec 5 cm<sup>3</sup> de soude molaire. Lorsque tout le produit de départ est transformé en  $\alpha$ -d-N-benzoyladénosine [CCM ( $CH_2Cl_2$ -MeOH) (80-20, v/v) :  $R_f=0,38$ ], le milieu réactionnel est neutralisé par addition de résine Amberlite IR 120 (forme pyridinium), puis la  $\alpha$ -d-bzA est purifiée par chromatographie sur gel de silice.

c) Une solution de  $\alpha$ -d-bzA (1 équivalent) dans la pyridine anhydre est traitée pendant 4 heures à la température ambiante avec le chlorure de diméthoxytrityle (1,1 équivalents) puis on termine la préparation comme l'exemple I-1 et I-2. CCM (système B) :  $R_f=0,32$ .

2) (Dmtr) $\alpha$ -d(bzA $\beta$ T $\beta$ )Cnet

On opère dans l'exemple I-4 en remplaçant la (Dmtr) $\alpha$ -T $\beta$  par la (Dmtr) $\alpha$ -d(bzA $\beta$ ), on obtient le dinucléotide totalement protégé.

5 3) (Dmtr) $\alpha$ -d(bzA $\beta$ T $\beta$ )

Le diester est obtenu par dëcyanoëthylation du composé X-2 selon l'exemple I-5.

4) (Dmtr) $\alpha$ -d(bzA $\beta$ T $\beta$ bzA $\beta$ T $\beta$ )Cnet

On opère comme dans l'exemple I-6 en remplaçant les composés (Dmtr) $\alpha$ (T $\beta$ T $\beta$ )Cnet et (Dmtr) $\alpha$ (T $\beta$ T $\beta$ ) respectivement par les composés des exemples X-2 et X-3. On obtient le tétranucléotide protégé.

5) (Dmtr) $\alpha$ -d(bzA $\beta$ T $\beta$ bzA $\beta$ T $\beta$ )bz

Le diester (Dmtr) $\alpha$ -d(bzA $\beta$ T $\beta$ bzA $\beta$ T $\beta$ ) (1 équivalent) (préparé par dëcyanoëthylation du composé X-4 selon l'exemple I-5) est couplé avec l' $\alpha$ -thymidine 3'-benzoyle (1 équivalent) selon l'exemple I-4 pour donner le pentanucléosidetétraphosphate protégé.

6) (Dmtr) $\alpha$ -d(bzC $\beta$ )

En partant de la 3',5'-diacétyl  $\beta$ -D-d(N-benzoylcytidine) (Chem. Pharm. Bull. 1984, 32, 1441-1450) et en opérant comme dans X-1-b et X-1-c, on obtient le diester. CCM (système B) : Rf=0,32.

7) (Dmtr) $\alpha$ -d(bzC $\beta$ bzC $\beta$ T $\beta$ T $\beta$ )Cnet

Le dinucléotide  $\alpha$ -(T $\beta$ )<sub>2</sub>Cnet (1 équivalent) (préparé par dëtritylation de (Dmtr) $\alpha$ -(T $\beta$ )<sub>2</sub>Cnet selon l'exemple II-5) est couplé avec le mononucléotide (Dmtr) $\alpha$ -dbzC $\beta$  (1 équivalent) en présence de MST (3 équivalents) selon l'exemple I-4 pour donner le trinucléotide protégé (Dmtr) $\alpha$ -d(bzC $\beta$ T $\beta$ T $\beta$ )Cnet qui à son tour est dëtritylé puis couplé avec le diester (Dmtr) $\alpha$ -dbzC $\beta$  comme précédemment.

30 8) (Dmtr) $\alpha$ -d(bzC $\beta$ bzC $\beta$ T $\beta$ T $\beta$ bzA $\beta$ T $\beta$ bzA $\beta$ T $\beta$ )bz

Le tétranucléotide 3'-phosphodiester (Dmtr) $\alpha$ -d(bzC $\beta$ bzC $\beta$ T $\beta$ T $\beta$ ) (1,2 équivalents) (préparé par dëcyanoëthylation du composé X-7 selon l'exemple II-5) est couplé avec le pentanucléotide

$\alpha$ -d(bzA $\beta$ T $\beta$ bzA $\beta$ T $\beta$ T)bz (1 équivalent) (obtenu par détritulation du composé X-5 selon l'exemple II-5) en présence de MST (3 équivalents) selon l'exemple I-4 pour donner le nonanucléotide protégé. CCM (système A) : Rf=0,55.

5 9) [Acr(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>] $\alpha$ -d(pCpCpTpTpApTpApTpT)

En partant du composé X-8 et en opérant comme dans les exemples II-5, II-6, II-7 et III-3, on obtient le produit déprotégé dont le temps de rétention est donné dans le tableau III.

TABLEAU III

	COMPOSES	SYSTEME DE SOLVANT	TEMPS DE
		(A-B, gradient linéaire)	RETENTION
10	I $\alpha$ -(Tp) <sub>8</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> Acr	de 0 à 50 % en B en 25 mn	9 minutes
	II [Acr(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> ] $\alpha$ -(pT) <sub>8</sub>	de 0 à 50 % en B en 25 mn	9 minutes
	III [Acr(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> ] $\alpha$ -(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> [ $\alpha$ -(sp)(Tp) <sub>7</sub> T]	de 0 à 60 % en B en 15 mn	15 mn 48 sec
15	IV [Prof(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> ] $\alpha$ -(sp)(Tp) <sub>7</sub> T	de 0 à 60 % en B en 15 mn	6 mn 54 sec
	V [PheCH <sub>2</sub> ] $\alpha$ -(sp)(Tp) <sub>7</sub> T	de 0 à 60 % en B en 15 mn	8 mn 6 sec
	VI [Acr(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> ] $\alpha$ -(pT) <sub>8</sub> (ps)	de 0 à 60 % en B en 15 mn	8 mn 48 sec
	VII [Acr(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> ] $\alpha$ -(pT) <sub>8</sub> (ps)CH <sub>2</sub> C(=O)C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> N <sub>3</sub>	de 0 à 60 % en B en 15 mn	17 mn 48 sec
	VIII [Acr(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> ] $\alpha$ -(pT) <sub>8</sub> (ps)CH <sub>2</sub> CO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	de 0 à 60 % en B en 15 mn	9 mn 12 sec
20	X [Acr(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> ] $\alpha$ -d(pCpCpTpTpApTpApTpT)	de 0 à 60 % en B en 15 mn	8 mn 54 sec
	$\alpha$ -(Tp) <sub>7</sub> T	de 0 à 50 % en B en 25 mn	9 mn
	$\alpha$ -(sp)(Tp) <sub>7</sub> T	de 0 à 60 % en B en 15 mn	10 mn 54 sec

HPLC - Colonne polyanion HR5/5 (Pharmacia), débit 1 cm<sup>3</sup>/mn

A : 10<sup>-3</sup>M phosphate de potassium (pH = 6)

25 B : M phosphate de potassium (pH = 6)

## REVENDICATIONS

$$\begin{array}{c} \text{R-L} \\ | \\ \text{---} \text{C} \text{---} \text{O} \text{---} \text{C} \text{---} \text{B} \\ | \quad | \\ \text{O} \quad \text{J} \\ | \\ \text{P} \text{---} \text{O} \\ | \quad || \\ \text{X} \quad \text{O} \end{array} \left[ \begin{array}{c} \text{O} \text{---} \text{C} \text{---} \text{O} \text{---} \text{C} \text{---} \text{B} \\ | \quad | \\ \text{O} \quad \text{J} \\ | \\ \text{P} \text{---} \text{O} \\ | \quad || \\ \text{X} \quad \text{O} \end{array} \right]_n \begin{array}{c} \text{O} \text{---} \text{C} \text{---} \text{O} \text{---} \text{C} \text{---} \text{B} \\ | \quad | \\ \text{O} \quad \text{J} \\ | \\ \text{P} \text{---} \text{O} \\ | \quad || \\ \text{X} \quad \text{O} \end{array}$$

- les radicaux B, identiques ou différents, représentant chacun une base nucléique naturelle ou modifiée,

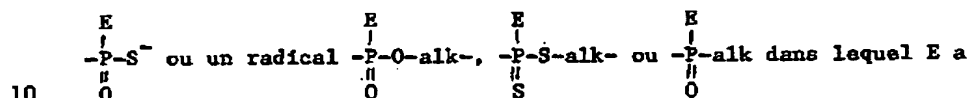
- L représente un atome d'oxygène ou de soufre ou un groupement -NH-,

-  $n$  représente un nombre entier qui peut être égal à zéro,

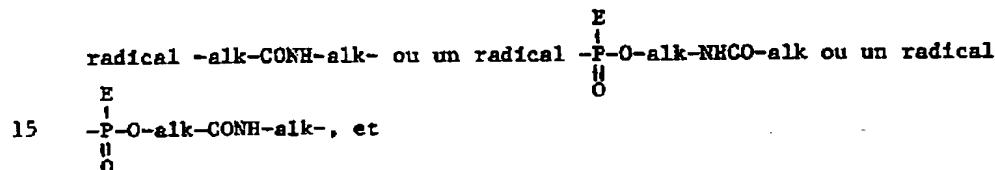
étant entendu que,

- lorsque L représentant un atome de soufre ou un groupement -NH-, les radicaux R et R', identiques ou différents, représentent chacun un atome d'hydrogène ou un groupement -Y-Z ou Y'-Z' dans lequel :

. Y et Y', identiques ou différents, représentent chacun un radical alcoylène droit ou ramifié (-alk-) ou un radical



les mêmes significations que X ou un radical -alk-O-alk- ou un



. Z et Z', identiques ou différents, représentent chacun un radical correspondant à un agent d'intercalation ou un radical porteur d'une fonction qui réagit directement ou indirectement avec les chaînes de nucléotides ou un radical dont la présence permet une

20 détection facile et sensible,

- lorsque L représentant un atome d'oxygène, les radicaux R et R', identiques ou différents, représentent chacun un atome d'hydrogène ou un groupement -Y-Z- ou Y'-Z' dans lequel Y, Y', Z et Z' sont définis comme précédemment, étant entendu que l'un au moins des radicaux R et R' contient un radical intercalant ou un radical chimique réactif,

25

- lorsque L représentant un atome d'oxygène, R et R' représentent chacun un atome d'hydrogène et B représente une base nucléique modifiée activable et/ou comportant un groupement intercalant.

30

2. Nouveau dérivé selon la revendication 1 caractérisé en ce que l'agent d'intercalation Z ou Z' est choisi parmi les composés polycycliques ayant une configuration plane.

3. Nouveau dérivé selon la revendication 2 caractérisé en ce que l'agent d'intercalation Z ou Z' est choisi parmi l'acridine et ses dérivés, la furocoumarine et ses dérivés, la daunomycine et les autres dérivés de l'anthracycline, la 1,10-phénanthroline, la phénanthridine et ses dérivés, la proflavine, les porphyrines, les dérivés du dipyrrodo [1,2-a:3',2'-d] imidazole, l'ellipticine ou l'ellipticinium et leurs dérivés et le diazapyrène et ses dérivés.

4. Nouveau dérivé selon la revendication 1 caractérisé en ce que les groupes chimiques réactifs Z ou Z' sont choisis parmi l'acide éthylène-diamine-tétraacétique, l'acide diéthylène-triamine-pentaacétique, les porphyrines, la 1,10-phénanthroline, l'azido-4 acétophénone, l'éthylène-imine, la  $\beta$ -chloroéthylamine et leurs dérivés.

5. Nouveau dérivé selon la revendication 1 caractérisé en ce que le radical B est un radical correspondant à la thymine, l'adénine, la 2-aminoadénine et ses dérivés substitués, la cytosine, la guanine et ses dérivés substitués, l'uracile, le bromo-5 uracile, l'azido-8 adénine, la 7-déazaadénine, la 7-déazaguanine et les dérivés de ces bases comportant un groupement intercalant et/ou un groupement chimiquement ou photochimiquement activable.

6. Nouveau dérivé selon la revendication 1 caractérisé en ce qu'il est choisi parmi :  $\alpha\text{--}[(\text{Tp})_n\text{T}](\text{Y}_1)\text{Z}_1$  ;  $\text{Z}_2(\text{Y}_2)\alpha\text{--}[(\text{Tp})_n\text{T}]$  ;  $\text{Z}_2(\text{Y}_2)\alpha\text{--}[(\text{Tp})_n\text{T}](\text{Y}_1)\text{Z}_1$  ;  $\text{Z}_2(\text{Y}_2)\alpha\text{--d}(\text{CpCpTpTpApTpApTpT})$ , A représentant un radical  $\alpha$ -D-désoxyadénosine, C représentant un radical  $\alpha$ -D-désoxycytidine, T représentant un radical  $\alpha$ -D-thymidine, n étant un nombre entier compris entre 1 et 25 ;  $\text{Y}_1$  et  $\text{Y}_2$  représentant un radical alcoylène contenant 1 à 10 atomes de carbone et  $\text{Z}_1$  et  $\text{Z}_2$  représentant chacun un dérivé de l'acridine ou un dérivé de la proflavine ou un dérivé de la 1,10-phénanthroline ou un dérivé de l'azido-4 acétophénone ou un dérivé de l'EDTA ou un dérivé de la biotine.

7. Procédé de préparation d'un nouveau dérivé selon l'une des revendications 1 à 6 caractérisé en ce que l'on prépare les dérivés totalement protégés et que l'on élimine les groupements protecteurs.



8. Procédé selon la revendication 7 caractérisé en ce que l'on couple un  $\alpha$ -D-oligonucléotide 3'-phosphodiester protégé avec l'hydroxyle de l'agent intercalant ou du groupe chimique réactif ou avec l'hydroxyle-5' d'un  $\alpha$ -D-oligonucléotide protégé possédant déjà l'agent d'intercalation ou le groupe chimique réactif.

9. Procédé selon la revendication 7 caractérisé en ce que l'on couple soit un  $\alpha$ -nucléotide 5'-phosphodiester protégé avec l'hydroxyle de l'agent intercalant ou du groupe chimique réactif soit un diester portant l'agent intercalant ou le groupe chimique réactif avec l'hydroxyle-5' d'un  $\alpha$ -D-oligonucléotide protégé.

10. Procédé selon la revendication 7 caractérisé en ce que l'on couple l'hydroxyle de l'agent intercalant ou du groupe chimique réactif avec un  $\alpha$ -D-oligonucléotide-3'-5'-bis-(phosphodiester) protégé.

11. Procédé selon la revendication 7 caractérisé en ce que l'on couple un diester porteur de l'agent intercalant ou du groupe chimique réactif avec l'hydroxyle-5' d'un  $\alpha$ -D-oligonucléotide protégé possédant déjà un agent intercalant ou un groupe chimique réactif.

12. Procédé selon la revendication 7 caractérisé en ce que l'on réalise la déprotection des groupes phosphoesters arylés en milieu anhydre à l'aide d'acide benzohydroxamique et en présence de base tertiaire non nucléophile.

13. Procédé de préparation d'un nouveau dérivé selon l'une des revendications 1 à 6 caractérisé en ce que l'on prépare les dérivés  $\alpha$ -D-oligonucléotides non protégés comportant un groupe thiophosphate à l'une des extrémités 3' ou 5' ou aux deux extrémités 3' et 5' de la chaîne nucléotidique.

14. Procédé selon la revendication 13 caractérisé en ce que l'on couple un  $\alpha$ -D-oligonucléotide 3'-thiophosphate non protégé avec un halogénoalkyle porteur de l'agent intercalant ou d'un groupe chimique.

15. Procédé selon la revendication 13 caractérisé en ce que l'on couple un  $\alpha$ -D-oligonucléotide 5'-thiophosphate non protégé avec un halogénoalkyle porteur de l'agent intercalant ou d'un groupe chimique.

5 17. Application d'un dérivé selon l'une des revendications 1 à 6 à titre de sonde pour la détection d'une séquence déterminée d'ADN ou d'ARN.

10 19. Application d'un dérivé selon l'une des revendications 1 à 6, dans lequel Z, Z' ou B représente ou contient un groupement activable, à titre de nucléase artificielle spécifique d'une séquence déterminée d'ADN ou d'ARN.

20 21. Application d'un dérivé selon l'une des revendications 1 à 6 pour bloquer sélectivement l'expression d'un ARN viral soit par hybridation soit par coupure soit par modification chimique de l'ARN viral ou de son ARN messager.

The diagram illustrates the chemical structure of a nucleic acid polymer. It features a sugar-phosphate backbone. The repeating unit is enclosed in large square brackets with a subscript 'n'. Each unit consists of a five-membered sugar ring (pentose or deoxyribose) connected to a phosphate group (P=O, with two single bonds to 'X' and one to the next sugar). The sugar ring has an oxygen atom at the top, a 'J' group at the bottom right, and a 'B' group at the top right. The backbone is linked by phosphate groups, with an 'H-O' group at the far left and an 'OH' group at the far right.

dans laquelle J et X sont définis comme dans la revendication 1 et B représente une base nucléique naturelle à titre de sonde pour la détection d'une séquence déterminée d'ADN ou d'ARN.

5 23. Application d'un dérivé tel que défini dans la revendication 22 à la purification d'une séquence déterminée d'ADN ou d'ARN.

10 24. Application d'un dérivé tel que défini dans la revendication 22 pour bloquer sélectivement l'expression d'un gène par hybridation sélective du gène ou de son ARN messager d'origine cellulaire, virale, bactérienne ou parasitaire.

25. Application d'un dérivé tel que défini dans la revendication 22 pour bloquer sélectivement l'expression d'un ARN viral ou de son ARN messager.

15 26. A titre de médicament nouveau un dérivé selon l'une des revendications 1 à 6 utilisable comme antiviral, antitumoral, antibiotique ou antiparasitaire ou dans toute pathologie où un gène est anormalement exprimé soit par mutation soit par dérégulation.

20 27. A titre de médicament nouveau un dérivé tel que défini dans la revendication 22 utilisable comme antiviral, antitumoral, antibiotique ou antiparasitaire ou dans toute pathologie où un gène est anormalement exprimé soit par mutation soit par dérégulation.

N° : 86 16 787

# AVIS DOCUMENTAIRE

(art. 19 de la loi n° 58-1 modifiée du 2 janvier 1985 ; art. 40 à 43 du décret n° 79-422 du 30 septembre 1979)

Etabli par :

Ph. ROTTER

Ingénieur examinateur à  
l'Institut national de la propriété industrielle  
(Division Technique des Brevets)

## OBJET DE L'AVIS DOCUMENTAIRE

■ Conférant à son titulaire le droit exclusif d'exploiter l'invention, le brevet constitue pour les tiers, une importante exception à la liberté d'entreprendre.

C'est la raison pour laquelle la loi prévoit qu'un brevet n'est valable que si, entre autres conditions, l'invention :

- est "nouvelle", c'est-à-dire n'a pas été rendue publique en quelque lieu que ce soit, avant sa date de dépôt,
- implique une "activité inventive", c'est-à-dire dépasse le cadre de ce qui aurait été évident pour un homme du métier.

■ L'Institut n'est pas habilité, sauf absence manifeste de nouveauté, à refuser un brevet pour une invention ne répondant pas aux conditions ci-dessus.

C'est aux tribunaux qu'il appartient d'en prononcer la nullité à la demande de toute personne intéressée, par exemple à l'occasion d'une action en contrefaçon.

L'Institut est toutefois chargé d'annexer à chaque brevet un "AVIS DOCUMENTAIRE" destiné à éclairer le public et les tribunaux sur les antériorités susceptibles de stopper à la validité du brevet.

## CONDITIONS D'ETABLISSEMENT DU PRESENT AVIS

■ Il a été établi sur la base des "revendications" dont la fonction est de définir les points sur lesquels l'inventeur estime avoir fait œuvre inventive et entend en conséquence être protégé.

■ Il a été établi à l'issue d'une procédure contradictoire (1) au cours de laquelle :

- ☒ le résultat d'une recherche d'antériorités effectuée parmi les brevets et autres publications a été notifié au demandeur et rendu public.
- ☐ les tiers ont présenté des observations visant à compléter le résultat de la recherche
- ☐ le demandeur a modifié les revendications pour tenir compte du résultat de cette recherche
- ☐ le demandeur a modifié la description pour en éliminer les éléments qui n'étaient plus en concordance avec les nouvelles revendications.
- ☒ le demandeur a présenté des observations pour justifier sa position.

## EXAMEN DES ANTERIORITES

- ☐ Cet examen n'a pas été nécessaire, car aucun brevet ou autre publication n'a été relevé en cours de procédure.
- ☐ Les brevets et autres publications (1), ci-après, cités en cours de procédure, n'ont pas été examinés car pour être efficace, cet examen suppose au préalable une vérification des priorités (2) :
- ☒ Les brevets et autres publications (1) ci-après, cités en cours de procédure, n'ont pas été retenus comme antériorités :

EP - A - 0 169 787      FR - A - 2 540 122  
NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol. 14, no. 12, 1986, pages 5019-5035

## CONCLUSION : EN L'ETAT, AUCUNE ANTERIORITE N'A ETE RETENUE

(1) - Les pièces du dossier, ainsi que les brevets et autres publications cités, peuvent être consultés à l'INPI ou délivrés en copie.  
(2) - Tout renseignement peut être obtenu de l'INPI : demander l'aide-mémoire "Intercalaires et Interférences".